

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

097147967 PCT/ SE 97/ 01003
1003

PRV
PATENT- OCH REGISTRERINGSVERKET
Patentavdelningen

REC'D 30 JUL 1997
WIPO PCT



**Intyg
Certificate**

Härmed intygas att bifogade kopior överensstämmer med de handlingar som ursprungligen ingivits till Patent- och registreringsverket i nedannämnda ansökan.

This is to certify that the annexed is a true copy of the documents as originally filed with the Patent- and Registration Office in connection with the following patent application.

(71) Sökande Pharmatrix AB, Sundbyberg SE
Applicant (s)

(21) Patentansökningsnummer 9602280-1
Patent application number

(86) Ingivningsdatum 1996-06-10
Date of filing

Stockholm, 1997-07-09

För Patent- och registreringsverket
For the Patent- and Registration Office

Hans Järvman

Avgift
Fee

PRIORITY DOCUMENT

**PATENT- OCH
REGISTRERINGSVERKET
SWEDEN**

Postadress/Address
Box 5055
S 102 42 STOCKHOLM

Telefon/Phone
+46 8 782 25 00
Vx 08-782 25 00

Telex
17978
PA1OREG S

Telefax
+46 8 666 02 86
08-666 02 86

IMMUNSTIMULERANDE LIPIDFORMULERING

BAKGRUND

Ett ökat antal specifika antigen från olika typer av organismer (ex tumörceller, bakterier, virus och parasiter) har producerats genom kloningtekniker under de senaste åren. Emellertid saknar dessa抗原er oftast den nödvändiga immunogeniteten trots mycket hög specifitet.

För att erhålla ett bra skydd vid vaccination behövs därför immunstimulerande system som kan förstärka och aktivera immunsystemet mot dessa svaga antigen. Dessa immunstimulerande system benämnes adjuvants.

Adjuvants, som f.n. användes nästan uteslutande i djurexperimentella studier, innehåller en mycket heterogen grupp av substanser; organiska substanser, oljeemulsioner, laddade polymerer, neutrala substanser eller substanser från bakterier.

F.n. pågår omfattande forskning och utveckling för att om möjligt ta fram ett säkert adjuvant med hög effektivitet för användning på människa. Emellertid saknas idag fortfarande ett generellt adjuvant för detta ändamål.

Aluminiumhydroxid samt aluminiumfosfat - var de första organiska substanserna som användes som adjuvant på människa. Immunsvaret beror i detta fall delvis på en sakta desorption av det utsällda antigenet från ytan av partikeln. Senare visades att fagocyterande celler attraheras av dessa alum-salter som även detta förstärker immunsvaret. Emellertid är dessa alumsalter inte såra adjuvant eftersom det har rapporterats granulombildning i samband med dess användning (Slater et al, Br.J.Dermatol., (1982) Vol. 107, sid. 103-108.). Vidare, så kan de ej användas vid alla typer av vaccination eftersom alla antigen ej kan adsorberas på ytan av partikeln.

1944 introducerade Freund sitt adjuvant som består av en blandning av olja, paraffin, detergener samt avdodade bakterier. Förstärkningen av immunsvaret är även i detta fall delvis beroende av en sakta utsöndring av antigenet från oljeemulsionen. Freunds adjuvant kan emellertid ej användas på människa pga granulombildning, inducering av auto-immuna reaktioner samt att mineraloljorna som användes kvarstannar under lång tid, åtminstone i djur. Dessutom är dess effekt svår att styra. Den aktiva substansen i Freunds adjuvant har isolerats och strukturstämmts och visade sig vara N-acetyl muramyl-L-alaninisoglutamin, som även går under namnet muramyl-dipeptid (MDP).

Adjuvanteffekt avseende partikelstorlek av polymetakrylat- och polystyren-partiklar undersöktes på moss (Kreuter et al, Vaccine, (1986) vol 4, 125-129) genom att använda ovalbumin (som adsorberats till partikeln) som modellantigen och immunsvaret analyserades.

Partikelstorlekar varierades mellan 62 och 306 nm. Mindre partiklar gav bättre adjuvanteffekt. De små partiklarna gav bättre effekt än 0.2% Al(OH)₃. Alla preparationer gav bättre respons än flytande preparationer.

- Generellt kan sägas att praktiskt taget samtliga idag använda och testade system för att öka den immunologiska aktiviteten mot antigen är i sig partiklar eller bildar partiklar tillsammans med antigenet. I boken "Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach" (Ed: Powell & Newman, Plenum Press, 1995) beskrives ingländska samtliga idag kända adjutants för att avseende deras immunologiska sätt som deras kemiska egenskaper. Man kan där utläsa att över 80% av idag använda adjutants består i sig av partiklar eller av polymerer som tillsammans med antigen (=oftast proteiner) bildar partiklar. De typer av adjutants som ej i sig är partikelbildande är en grupp substanser som fungerar som immunologiska signalsubstanser och som under normala betingelser bildas efter administrering av partikulära adjunktssystem.
- Vid användandet av partikulära system som adjutants associeras eller blandas ofta antigenet med eller i en matris som har den egenheten att den siktat skall brytas ner *in vivo*. Av stor betydelse vid arbete inom detta område är att matrisen vid nedbrytning ej bildar eller ger upphov till toxiska metaboliter. Vid val utifrån denna ståndpunkt blir man därvid huvudsakligen hanvisad till att använda matriser som är uppbyggda av kroppsegna substanser. Med denna bakgrund finns ett antal olika system att arbeta inom som upptyller dessa krav: mjölkssyrapolymerer, polyaminosyror (proteiner), kolhydrater, lipider samt syntetiska polymerer som uppvisar biokompatibilitet och låg eller ingen toxicitet. Även kombinationer av dessa grupper av kroppsegna substanser eller kombinationer av kroppsegna substanser och biokompatibla substanser kan användas. Lipider är här att föredra eftersom de alla uppvisar strukturer som gör att de är nedbrytbara *in vivo* samt ingår som den viktigaste beständsdelen i alla biologiska membran.
- Lipider karakteriseras som polara eller icke-polara. De lipider som här är av rikt i dessa uppfinning är de polara eftersom de har förmåga att bilda partikulära system i vatten. Man brukar även definiera dessa typer av lipider som anfilita eftersom de har en hydrofob och en hydrofil del i sin molekyl och därigenom kan fungera som ytaktiva substanser. Exempel på huvudgrupper av polara lipider är mono-glycerider, fettsyror, fosfolipider samt glycosteingolipider. Dessa huvudgrupper kan i sin tur ytterligare karakteriseras beroende på acylkedjans antal kolatomer samt denna kolkedjans mättadssgrad. Eftersom antalet kolatomer kan varieras mellan huvudsakligen 6 och 24 och antalet dubbelbindningar kan varieras mellan dessa kolatomer finns ett nästan oändligt antal kombinationer på acylkedjans kemiska uppbyggnad.
- De partikulära lipid-systemen i sin tur kan indelas efter de olika benämningar som diskuteras i den vetenskapliga litteraturen såsom liposomer, emulsjoner, cubosomes, cochleates, miceller, etc.
- I många system kan lipiderna i sig själva spontant bilda, eller formas bilda, stabila system. Emellertid, under vissa förhållanden måste man tillföra andra ytaktiva substanser för att erhålla stabila system. Dessa ytaktiva substanser kan vara av icke-lipid karakter men uppvisar denna typ av föreningars typiska egenskap att såsom de polara lipiderna ha en

hydrofob och en hydrofil del i sin molekylstruktur.

Ytterligare en faktor som har betydelse är att lipider upptäcks olika fysikal-kemiska faser, dessa faser har i olika testsystem visats ge ökat upptag av biologiskt aktiva substanser efter administrering till mucosan.

- 5 I den klassiska immunologin och i samband med vaccination mot olika typer av infektioser, ex. bakterier, virus eller parasiter har den förhärskande dogmen varit att administrera 10 vaccinet subkutant eller intramuskulärt. Emellertid har forskningen visat under de senaste åren att kroppen har ett mycket effektivt immunologiskt system vars effekt huvudsakligen finns i mucosan. Det har visats att man kan vaccinera genom att administrera vaccin oralt, närsalt, rektalt eller vaginalt. På samma sätt som för de klassiska parenterala vaccinerna har visats att även vid mucosavaccinering finns behov att förstärka det immunologiska svaret genom att tillföra adjuvants.
- 15 På samma sätt som inom den klassiska immunologin där vacciner (antigener) administreras parenteralt, är det även inom mucosaimmunologin av stort intresse att kunde styra immunsystemet mot utveckling av ett humoralt och/eller ett cellulärt svar. Om man erhåller ett humoralt svar skulle det vara väsentligt att kunna styra svaret så att en viss önskad antikroppsklass erhålls. För att eventuellt kunna nå detta mål kan specifika 20 immunstimulerande substanser tillföras samtidigt som blandningen av antigen och adjuvant.
- 25 Olika typer av immunstimulerande substanser finns att utnyttja. Den ena typen är proteiner, ex PHA, Con A, SEA eller olika typer av interferoner eller interleukiner. En annan typ av substans representeras av ovan nämnda MDP. Ytterligare grupper kan karakteriseras såsom lipidderivat eftersom de upptäcks molekylstrukturer som är amfifila. Ett exempel på sällan substans går under benämning MPL. En annan likartad substans är Quil A. Ytterligare en rad substanser av samma kategori finns beskrivna i boken "Vaccine Design - the subunit and adjuvant approach" som diskuteras ovan.
- 30 Det skulle vara utomordentligt värdefullt att kunna effektivisera immuniseringss- procedurerna och göra det möjligt att immunisera patienter, att kunna styra den till dominans av en viss antikroppsklass eller subklass samt att kunna inducera ett starkt T-cell svar mot antigenet.
- 35 Denna upfinning behandlar lipider som blandade med ett antigen ökar immunsystemets aktivitet mot antigenen och därigenom kan fungera som adjuvants i olika vaccinberedningar. I synnerhet innehåller upfinningen användning av en formulering för vaccinering av mucosan som immunologiskt kan aktiveras genom nasal, oral, vaginal eller rectal administrering. Emellertid visar upfinningen att det beskrivna lipidssystemet även fungerar utmärkt vid parenteral administrering.
- I den vetenskapliga litteraturen finns rapporterat hur man med hjälp av olika partikulära lipidssystem kan erhålla ett ökat upptag av en biologiskt aktiv substans efter administrering

- till mucosan tillsammans med vissa lipider. Som ett exempel kan nämnas att Li & Mitra (Pharm.Res. vol 13:1, 1996) beskriver tillförsel av insulin till lungan blandat med olika fosfolipider i form av liposomer. De visar att effekten sfa är beroende på acylkedjans längd samt partikelns laddning. Optimal längd var ca 10 kolatomer och partikels laddning foretradesvis positiv. Även negativt laddade system fungerade bra medan neutrala system var sämre.
- 5
På likartat sätt har de Haan et al (Vaccine, 13:2, s. 155-162, 1995) blandat liposomer och antigenet hemagglutinin. Blandningen administrerades i näsan på råttor varefter ett positivt immunologiskt svar kunde detekteras. Gupta et al, (Vaccine, 14:3, 219-225, 1995) visar att endast en blandning av difteritoxoid tillsammans med ett icke fosfolipid baserat liposomsystem som administreras parenteralt till kaniner ger ett immunologiskt svar som motsvarar den befintliga produkten bestående av Alum-adsorberad difteritoxoid.
- 10
En hel rad vetenskapliga rapporter finns även redovisade där man erhåller goda immunologiska svar efter administrering av liposomer till mucosan där antigenen varit adsorberade eller inneslutna i liposomerna.
- 15
I en in vitro studie på en human cell linje från en coloncancer (Caco-2) visar Lindmark et al (J.Pharm.Exp.Ther. 275, 958-64, 1995) att bästa penetrerande effekt testat med modellsubstansen mannitol erhålls med en kolkedjelängd av 10 kolatomer. I detta fall bestod lipiderna av saltet av rena fettsyror. Den så erhållna blandningen av dessa lipider tillsammans med vatten bildar miceller. Med utnyttjande av samma celllinje kan man även studera toxiciteten av beredningar. I ovanstående fall visade Lindmark att fettsyror med 12 kolatomer har en överlägsen förmåga att öka penetreringen av mannitol genom Caco-2 cellerna utan att uppvisa några synbara toxiska effekter. Den toxiska effekten avlastes i detta fall genom att studera Caco-2 cellerna via elektronmikroskop. Ett annat sätt att avläsa toxicitet är att studera vissa enzymers funktion under påverkan av substanser som har för avsikt att öka penetreringen av biologiskt aktiva substanser; s.k. enhancers. Denna metod går allmannt under namnet MTT.
- 20
Liposomer består av fosfolipider och tillverkas genom en tamligen omständig process som bl.a. innehåller organiska lösningsmedel. Dessutom betingar fosfolipider ett högt inkoppspris. I nedanstående beskrivning av denna uppfannning visas att ett likartat immunologiskt svar kan erhållas endast genom att blanda antigen med en lipidformulering som innehåller mindre komplicerade lipider som betingar ett väsentligt lägre pris samt kan tillverkas i kommersiell skala på ett mycket enkelt sätt.
- 25
Denna uppfannning visar att endast blandning av antigen tillsammans med adekvata lipider har förmåga att stimulera kroppen att bilda ett skyddande immunsvar. Ytterligare en fördel som denna enkla metod har med sig jämfört med inneslutningsmetoder är att inget material (antigen) går förlorat i processen. Som exempel kan nämnas att vid inneslutning av antigen i liposomer erhålls normalt 10-20% utbyte av antigen. Resten förloras i processen.
- 30
35

Litteraturuppgifterna ovan visar att man genom att endast blanda liposoner och antigen kan erhålla ett immunologiskt svar efter administrering till mucosan.

Emellertid visar exemplen i denna uppföring att systemet kan göras kommersiellt annu mer tilltalande genom att använda lipider som är stabilare, billigare och som på ett mycket enklare sätt kan formuleras till ett partikulärt system.

Uppfinningen exemplifieras genom några exempel som visar att principen att administrera ett antigen i kombination med det beskriva lipidsystemet fungerar som ett adjuvant.

10 **Exempel 1.**

En suspension av monoolein tillverkades genom att tillföra 3 g monoolein till 50 ml 0,6% Pluronic 127 lösning i PBS varefter blandningen sonikerades med en probesonicator (Branson) under 4 minuter. Den erhållna mjölkvita suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 2 µm.

15 **Exempel 2.**

En negativt laddad micellsuspension av monoolein tillverkades genom att blanda 0,5 g oljesyra till 5 ml 0,35 M NaOH och sonikera med en probesonikator under ca 5 sekunder. Därefter tillfördes 3 g monoolein och 50 ml PBS varefter blandningen sonikerades med en probesonicator (Branson) under 4 minuter varefter pH justerades till mellan 8 och 9 med 0,35 M NaOH. Den erhållna helt genomskinliga och glasklara suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 0,2 µm.

20 **Exempel 3.**

En positivt laddad micellsuspension av monoolein tillverkades genom att blanda 0,5 g laurylamin till 3,5 ml 0,5 M HCl och sonikera med en probesonikator under ca 5 sekunder. Därefter tillfördes 3 g monoolein och 50 ml vatten varefter blandningen sonikerades med en probesonikator (Branson) under 4 minuter varefter pH justerades till mellan 4 och 5 med 0,5 M HCl. Den erhållna helt genomskinliga och glasklara suspensionen består av partiklar med en maximal storlek av ca 0,2 µm.

25 **Exempel 4.**

En blandning mellan monoolein, Pluronic och difteritoxoid tillverkade enligt exempel 1, gavs subkutan till moss med efterföljande subkutan booster efter 21 dagar. Efter 30 dagar togs blodprover som analyserades avseende IgG-antikroppar mot difteritoxin samt analys av skyddande antikroppar genom en s.k. Verocell analys. Resultatet visade att både IgG och skyddande antikroppstitrar befann sig på samma nivå som hos kontrolldjuren som fick den

befintliga produkten bestående av ditteritoxoid adsorberat på aluminiumfosfat.

Exempel 5.

Samma som Exempel 4 med r: skillnaden att boosternt gavs nasalt i stället för subkutant. Även här visade resultatet avseende IgG samt skyddande antikroppar att de erhållna titrarna var på samma nivå som den befintliga produkten.

Exempel 6.

Samma som Exempel 4, med skillnaden att båda administreringarna gavs nasalt samtidigt med rCTB tillfördes blandningen. Även här visade resultatet avseende IgG antikroppar att de erhållna titrarna var på samma nivå som den befintliga produkten.

Exempel 7.

En blandning mellan monoolein och oljesyra i form av en micellsuspension blandades med ditteritoxoid och rCTB och gavs nasalt till möss med nasal booster efter 21 dagar. Efter 30 dagar togs blodprover som analyserades avseende IgG-antikroppar mot ditteritoxin. Resultatet visade att IgG antikroppstitrar befann sig på samma nivå jämfört med kontrolldjuren som fick den befintliga produkten bestående av ditteritoxoid adsorberat på Aluminiumfosfat.

Exempel 8.

For att utrона toxiciteten av de framställda lipidformuleringarna administrerades dessa i näsan på råttor varefter vid olika tidpunkter råttorna avlivades och den nasala slémhinnan fripreparerades. Preparaten granskades efter färgning med hjälp av ljus- och fluorescensmikroskop samt med svepelektronmikroskopi (SEM). Endast monoolein/pluronic suspensionen upptäcktes senare förändringar av ciliar synbara i SEM. Inga toxiska effekter kunde observeras vid den ljus- eller fluorescensmikroskopiska undersökningen.

Exempel 9.

Caco-2 celler, som är en human celllinje (coloncancer) som växer ut som ett monolager av epitelisknande celler. Den användes mycket frekvent för att utrона olika substansers förmåga att påverka transport av biologiskt aktiva substanser genom epithelceller och har i ett antal experimentella system visat sig ge mycket god korrelation till in vivo data avseende upptag från tarmen. Som markör av transport genom cellerna användes Na-fluorescein och manitol. Experimenten visade att lipidformuleringarna ger en ökning av transporten genom cellerna vid icke-toxiska koncentrationer vilka bestämdes genom den s.k. MTT metoden.

PATENTKRAV

- 5 1. Immunstimulerande system, **kännetecknat av**, att抗原er är blandade med ett partikulärt lipidsystem.
- 10 2. Immunstimulerande system enligt krav 1, **kännetecknat av**, att det partikulära lipidsystemet består av en eller flera polara lipider i en vattenfas.
- 15 3. Immunstimulerande system enligt krav 2, **kännetecknat av**, att de polara lipiderna kommer ur någon av grupperna monoglycerider, fettsyror, eller derivat av dessa.
4. Immunstimulerande system enligt krav 1, **kännetecknat av**, att det partikulära lipidsystemet består av en blandning av en eller flera polara lipider samt en eller flera ytaktivitativa substanser i en vattenfas.
5. Immunstimulerande system enligt krav 1-4, **kännetecknat av**, att till det partikulära lipidsystemet har tillförlits ytterligare immunologiskt stimulerande substans.

5

1
2
3
4
5
6
7

PRU 96-06-10 M

SAMMANFATTNING

5 Ett immunstimulerande system beskrives, var i antigener och immunstimulerande substanser blandas med ett lipidsystem, som vid in vivo användning ger ett förstärkt immunsvär mot antigenet.

Åke Wesslen
Lund University

100 99 98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88 87 86 85 84 83 82 81 80 79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52 51 50 49 48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)